

Pilotná analýza troch cytokínov u pacientov s diagnostikovanou depresiou

Babušíková Eva¹; Ondrejka Igor²; Hrtánek Igor², Dobrota D¹

e-mail: eva.babusikova@jfmed.uniba.sk

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, ¹Ústav lekárskej biochémie, ²Psychiatrická klinika, Slovenská republika

ABSTRAKT

Patogenéza veľkej depresie (*major depressive disorder*, MDD) stále nie je objasnená. Depresia patrí medzi ochorenia s najväčšou globálnou záťažou a predpokladá sa, že bude druhou hlavnou príčinou zdravotného postihnutia. Hľadanie biologických markerov závažnej MDD by mohlo byť dôležité pre zlepšenie starostlivosti o pacientov a vývoj účinnejších liečebných postupov. Cytokíny hrajú v organizme mnohé kľúčové úlohy a majú pleiotropné účinky. Vaskulárny endoteliálny rastový faktor je dôležitý pre vaskulogenézu, angiogenézu a vaskulárnu permeabilitu. Monocytový chemotaktický proteín-1 môže ovplyvňovať vrodenu a získanú imunitu reguláciu monocytov a Th systémov 1 a 2. Epidermálny rastový faktor participuje na regulácii bunkovej proliferácii a diferenciácii. Všetky tri hrajú významnú úlohu i v mozgu a mohli by participovať na vzniku a rozvoji MDD. U pacientov s diagnostikovanou MDD sme pozorovali štatisticky významné zvýšenie koncentrácie všetkých troch cytokínov. Zmeny v syntéze cytokínov by mohli prispievať k určitému fenotypu ochorenia. Po detailnejšom štúdiu by sa mohla zhodnotiť ich využiteľnosť ako diagnostických či prognostických biomarkerov MDD.

Kľúčové slová: depresia, cytokíny, rastové faktory

ÚVOD

Veľká depresívna porucha (depresia, *major depressive disorder*, MDD) je vážne duševné ochorenie, ktoré ohrozuje celkové zdravie človeka. Depresia je mentálne ochorenie, ktoré je charakterizované úpadkom nálady počas dvoch týždňov (pocity smútku, skleslosti, vnútorného napätia, spomalenie duševných a telesných procesov, strata záujmov a schopnosti tešiť sa). Ťažká depresia je kvôli svojej opakujúcej sa a život ohrozujúcej povahe jednou z 10

najčastejších chorôb z hľadiska globálneho zaťaženia chorobami. Toto ochorenie má vysokú chorobnosť, vysokú mieru recidív, vysokú mieru zdravotného postihnutia, vysokú mieru samovrážd a veľkú ekonomickú záťaž. Svetová zdravotnícka organizácia (*World health organisation*, WHO) predpokladala, že v roku 2020 bude MDD druhou najčastejšou príčinou postihnutia v populácii. Od decembra 2019 sa postupne celý svet potýka s pandémiou COVID-19. Práve táto pandémia podľa prieskumu WHO narušila alebo zastavila služby kritického duševného zdravia v 93% krajín sveta (webové sídlo WHO). Rôzne typy opatrení – najmä tých silnejších ako zákazy vychádzania, prezenčnej výučby, prezenčnej práce, sociálnych kontaktov okrem členov jednej domácnosti prispievajú neustále, keďže pandémia stále pokračuje, k duševným problémom a vzniku duševných porúch. Obzvlášť kritická je nedostupnosť duševnej zdravotnej starostlivosti. Depresia je charakterizovaná zmenou nálady a psychomotorickej aktivity, zmenami neurovegetatívnych (apetít, spánok) a kognitívnych funkcií (pocit viny a menejcennosti) a somatickými symptómami (Fava a Kendler, 2000).

Aj keď etiológia MDD nie je v súčasnosti jasná, početné štúdie naznačujú, že oxidačné poškodenie (oxidačný stres), zápal, neuro-imunitné dráhy, serotonergný systém, katabolizmus tryptofánu. Depresia je následok abnormalít v interakciách medzi neurotransmitermi a hormónmi v mozgu (serotonergný a dopaminergný systém). Nedostatok odpovede organizmu na antidepresíva a rezistencia na liečbu podnietili úvahy o tom, že aj ďalšie mechanizmy môžu zohrávať úlohu v patogenéze depresie. Štúdie ukázali, že pacienti s depresiou môžu mať porušenú reguláciu imunitného systému, čo by mohlo vysvetľovať nedostatočný terapeutický prínos antidepresív. Stimuly ako zápal, chronický stres alebo infekcia môžu spustiť aktiváciu mikrogliie, ktorá následne produkuje zápalové cytokíny (Otte et al, 2016). Cytokíny môžu spôsobiť zmeny v mozgových procesoch podieľajúcich sa na kontrole termogenézy, správania, spánku a nálady (Kronfol, 2003). Tieto molekuly v konečnom dôsledku spôsobujú neurochemické, neuroendokrinné, neuroimunitné a behaviorálne zmeny. Cytokín je všeobecné pomenovanie zahrňujúce lymfokíny, monokíny, chemokíny, interleukíny, interferóny, tumor nekrotizujúce faktory a rastové faktory, ktoré sú peptidy alebo bielkoviny. Z rastových faktorov sme sa v našej pilotnej štúdii zamerali na vaskulárny endoteliálny rastový faktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), monocytový chemotaktický proteín-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP1) a epidermálny rastový faktor (*epidermal growth factor*, EGF).

Vaskulárny endoteliálny rastový faktor, ktorý je dôležitý pre vaskulogenézu, angiogenézu, vaskulárnu permeabilitu a homeostázu, bol izolovaný a naklonovaný pred takmer tridsiatimi rokmi (Ferrara and Adamis, 2016). Tento cytokín je dôležitý pre vaskulárnu

homeostázu v mnohých bunkách a tkanivách. Vaskulárny endoteliálny rastový faktor sprostredkováva angiogénu v mozgu, neurálnu migráciu, a neuroprotekcii. Rodina VEGF obsahuje aspoň šesť členov: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E a placentálny rastový faktor (Ferrara a kol., 2003). Sú to sekrečné bielkoviny. Expresia VEGF je regulovaná prostredníctvom hypoxiou indukovateľného faktora (HIF), epidermálneho rastového faktora (epidermal growth factor, EGF), doštičkového rastového faktora (platelet derived growth factor, PDGF) (Semenza, 2000). Okrem physiologických úloh má VEGF mnohé patologické úlohy v rôznych neurologických ochoreniach (Shim a Madsen, 2017).

Monocytový chemotaktický proteín-1 je CC-chemokín, ktorý hrá veľmi dôležitú úlohu v zhromažďovaní monocytov, čo vedie k zápalovej reakcii a T-lymfocytov cez reguláciu systémov Th1 a Th2. Tento chemokín, známy tiež ako chemokínový (C-C motív) ligand 2 (CCL-2), je produkovaný konštitutívne, alebo po indukcii oxidačným stresom, cytokínmi, rastovými faktormi mnohých buniek (Koyanagi M a kol., 2000; Traynor a kol., 2002). Expresia MCP1 môže súvisieť aj s vývojom rôznych ochorení centrálneho nervového systému, vrátane sklerózy, Alzheimerovej choroby a depresie. Monocytový chemotaktický proteín-1 môže ovplyvňovať vrodenu a získanú imunitu reguláciu monocytov a Th systémov a môže prispievať k rozvoju depresie, čo by podporovalo Th1/Th2 hypotézu etológie depresie (Schwarz a kol., 2001).

Epidermálny rastový faktor je peptid, ktorý participuje na regulácii bunkovej proliferácii, diferenciácii, prežívaní, migrácii a apoptóze. Na základe jednej z hypotéz o etiológii depresie, EFG sprostredkováva regulácie vývoja dopaminergných neurónov a metabolizmu monoamínov v organizme (Iwakura a kol., 2011; Eda a kol., 2013).

Depresia je u pacientov stále diagnostikovaná na základe klinických príznakov. Hľadanie špecifických biologických markerov má veľký význam pre pokrok v diagnostickej metóde depresie ako i hľadání odpovedí na príčiny neefektívnej liečby u mnohých pacientov.

PACIENTI A METÓDY

Subjekty

Študovaná populácia mala 60 účastníkov. Tridsať pacientov (56,67 % mužov a 43,33 % žien) s diagnostikovanou depresiou bolo získaných na Psychiatrickej klinike Jeseniovej

lekárskej fakulty v Martine. Tridsať zdravých dobrovoľných darcov krvi (53,33 % mužov a 46,67 % žien), ktorých sme označili ako kontrolná skupina, bolo bez psychiatrickej diagnózy. Všetci boli poučení o pilotnej štúdií, ktorá bola schválená Etickou komisiou Jesseniovej lekárskej fakulty v Martine Univerzity Komenského v Bratislave.

Príprava plazmy

Žilová krv bola odobratá do skúmavky s kyselinou etyléndiamíntetraoctovou (EDTA). Krv sa po prenesení na Ústav lekárskej biochémie Jesseniovej lekárskej fakulta v Martine použila na prípravu plazmy. Krv sa centrifugovala 20 minút pri 4°C a 2000 otáčok/minútu. Po centrifugácii sa odobrala plazma, z ktorej sa pripravili alikvotné vzorky a uskladnili sa do použitia pri -20 °C a -70 °C.

Determinovanie koncentrácie cytokínov

Na kvantitatívne stanovenie troch cytokínov: vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF), monocytový chemotaktický proteín-1 (MCP1) a epidermálny rastový faktor (EGF) sa použila diagnostická súprava *Cytokine and Growth Factors High Sensitivity Array*, firmy Randox a postupovalo sa podľa priloženého postupu. Vzorky sa analyzovali na analyzátore bielkovinových a molekulových biočipových testov *Evidence Investigator* (Randox, Írsko).

Štatistická analýza

Získané údaje boli analyzované pomocou testu ANOVA a Studentovho t-testu a sú uvedené ako priemer \pm SEM – stredná chyba priemeru (*Standard error of mean*, S.E.M.). Za štatisticky významné výsledky sme považovali hodnoty štatistickej významnosti – p rovné a menšie ako 0,05.

VÝSLEDKY

V našej štúdií sme analyzovali koncentráciu troch cytokínov: vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora (VEGF), monocytového chemotaktického proteínu-1 (MCP1) a epidermálneho rastového faktora (EGF). V tabuľke 1 je základná charakteristika súboru pacientov s diagnostikovanou depresiou ako i kontrolnej skupiny. Diagnóza pacientov bola potvrdená dvoma nezávislými testami podľa Diagnostického a štatistického manuálu pre mentálne ochorenia (DSM-5, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition*) a Montgomery-Åsberg klasifikačnou škálou depresie (MADRS, *Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale*). Pacienti v našej pilotnej štúdií tvorili homogénnu skupinu. Všetci až na jedného pacienta mali MADRS skóre nad 34, čo predstavuje ťažkú formu depresie (44,56; 38 – 56). V tabuľke 2 je znázornené vekové zastúpenie populácie.

Tabuľka 1: Charakteristika študovanej populácie

Populácia	Počet (%)	MADRS 34	MADRS 35-60	DSM-5 296.23	DSM-5 296.33
zdraví jedinci					
Muži	16 (53,33)	N	N	N	N
Ženy	14 (46,67)	N	N	N	N
Spolu	30 (100)	N	N	N	N
MDD					
Muži	17 (56,67)	1 (3,33)	16 (53,33)	9 (30,0)	8 (26,67)
Ženy	13 (43,33)	0	13 (43,33)	7 (23,33)	6 (20,0)
Spolu	30 (100)	1 (3,33)	29 (96,67)	16 (53,33)	14 (46,67)

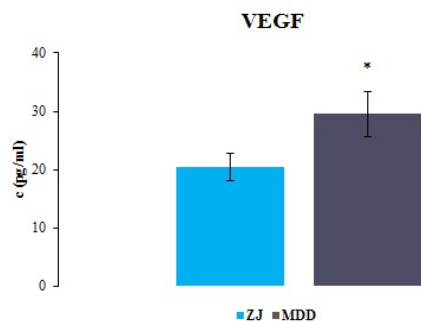
MADRS – Montgomery-Åsberg škála pre posúdenie depresie (*The Montgomery-Åsberg depression rating scale*), DSM-5 – Diagnostický a štatistický manuál mentálnych chorôb, 5. edícia (*Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorder, Fifth Edition*), MDD – depresia (*Major depressive disorder*), N – nepoužiteľné

Tabuľka 2: Vek študovanej populácie

Populácia	Vek	S.E.M.	Medián	Min - Max	p
zdraví jedinci					
Muži	41,69	2,4	43,5	27 - 54	0,50
Ženy	43,29	2,9	43,5	24 - 61	0,32
Spolu	42,43	1,71	43,5	24 - 61	0,24
MDD					
Muži	44,53	3,57	46	19 - 64	
Ženy	48,69	4,53	51	18 - 68	
Spolu	46,33	2,8	49,5	18 - 68	

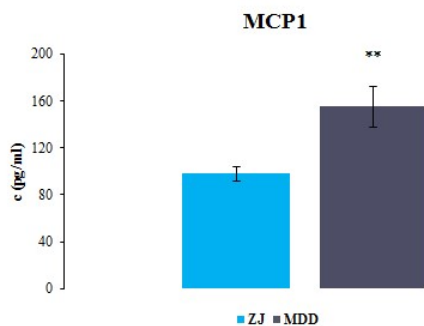
S.E.M. – stredná chyba priemeru (*Standard error of mean*), Min – minimum, Max – maximum, p – štatistická významnosť, MDD – depresia (*Major depressive disorder*)

Koncentrácia vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora (VEGF) u pacientov s depresiou bola $29,55 \pm 3,88$ pg/ml. Koncentrácia VEGF bola o 44,92 % vyššia v porovnaní so zdravými jedincami, čo predstavuje štatisticky významný rozdiel $p = 0,046$ (obrázok 1). Medián VEGF u pacientov bol 22,40 pg/mol (8,89 – 96,48 pg/mol) a u zdravých jedincov 16,03 pg/mol (8,82 – 60,60 pg/mol).



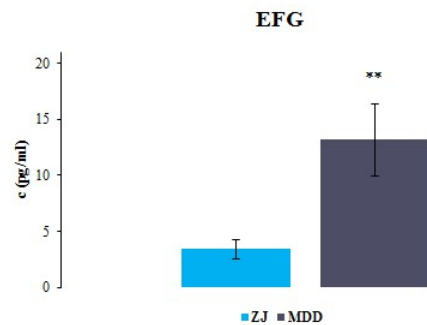
Obrázok 1: Koncentrácia vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora. VEGF – vaskulárny endoteliálny faktor, ZJ – zdraví jedinci, MDD - pacienti s depresiou. Hodnoty sú uvedené ako priemer \pm S.E.M., * $p < 0,05$.

Na obrázku 2 sú znázornené výsledky koncentrácie monocytového chemotaktického proteínu-1 (MCP1). Koncentrácia MCP1 u pacientov s depresiou bola $155,05 \pm 17,73$ pg/ml čo predstavuje predstavovalo nárast o 58,32 % oproti koncentrácii u zdravých jedincov, $p = 0,004$. Medián MCP1 u pacientov bol 157,13 pg/mol (33,45 – 498,82 pg/mol) a u zdravých jedincov 86,31 pg/mol (25,85 – 213,9 pg/mol). Väčšina pacientov s depresiou mala (63,33 %) zvýšenú koncentráciu MCP1 nad fyziologickú hodnotu.



Obrázok 2: Koncentrácia monocytového chemotaktického proteínu 1. MCP1 – monocytový chemotaktický proteín 1, ZJ – zdraví jedinci, MDD - pacienti s depresiou. Hodnoty sú uvedené ako priemer \pm S.E.M., ** $p < 0,01$.

Koncentrácia epidermálneho rastového faktora (EGF) u pacientov s depresiou bola $13,17 \pm 3,21$ pg/ml (obrázok 3). Oproti zdravým jedincom bola koncentrácia EFG o 287,35 % vyššia $P = 0,0048$. Medián EFG u pacientov bol 3,92 pg/mol (0,53 – 64,78 pg/mol) a u zdravých jedincov 1,79 pg/mol (0,63 – 25,02 pg/mol).



Obrázok 3: Koncentrácia epidermálneho rastového faktora. EFG – epidermálny rastový faktor, ZJ – zdraví jedinci, MDD - pacienti s depresiou. Hodnoty sú uvedené ako priemer \pm S.E.M., ** $p < 0,01$.

DISKUSIA

Pre MDD je charakteristické vážne duševné poškodenie, ktoré ohrozuje celkové zdravie človeka. Depresia má vysokú chorobnosť, vysokú mieru recidívy, zdravotného postihnutia, samovrážd a predstavuje veľkú ekonomickú záťaž. V našej pilotnej štúdií sme sa venovali analýze troch cytokínov. U všetkých troch: vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora, monocytového chemotaktického proteínu-1 a epidermálneho rastového faktora sme pozorovali u pacientov s diagnostikovanou depresiou štatisticky významný nárast koncentrácie oproti kontrolnej skupine. Fyziologické koncentrácie pre tieto cytokíny sú stále predmetom analýz vo všetkých telesných tekutinách. Napriek tomu v plazme sa pre VEGF udáva fyziologická koncentrácia $\leq 56,17$ pg/mol, pre MCP1 12,98 – 136,18 pg/mol a pre EGF $\leq 113,58$ pg/mol.

V literatúre môžeme nájsť množstvo protichodných informácií a výsledkov podobných experimentov a štúdií, preto žiaden z týchto troch cytokínov nie je využívaný ako biomarker. Napriek tomu sa ukazuje, že VEGF, MCP1 ako i EFG majú aktivitu nielen za fyziologických podmienok, ale môžu za patologických podmienok participovať na vzniku ochorení, ich rozvoji

a prispievať k rôznym endotypom daného ochorenia. Zvýšená koncentrácia VEGF u pacientov s MDD bola zistená vo viacerých štúdiách, čo je v zhode s našimi pilotnými výsledkami (Carvalho a kol., 2015; Tseng a kol., 2015; Becerril-Villanueva a kol., 2019; Lee a Kim., 2012). Nezmenená koncentrácia VEGF u pacientov s depresiou bola taktiež zaznamenaná (Kotan a kol., 2012, Ryan a McLoughlin, 2018).

Koncentrácia MCP1 bola v plazme pacientov s depresiou štatisticky významne zvýšená oproti koncentrácii MCP1 u zdravých jedincov. Navyše 63,33 % pacientov malo koncentráciu zvýšenú nad fyziologickú hodnotu. Ukazuje sa, že MCP1 môže hrať úlohu v modulácii iných cytokínov a môže hrať významnú úlohu v MDD vzhľadom na jeho prepojenie s kľúčovými cytokínmi, neurotransmitermi a neuropeptidmi (Pae, 2014). Zvýšená koncentrácia MCP1 bola pozorovaná aj v iných štúdiách (Xiong a kol., 2015; Eyre a kol., 2016; Sutcliffe a kol., 2007).

ZÁVER

Zmeny v koncentráciách cytokínov – rastových faktorov, ktoré participujú na vývoji mozgu a zohrávajú kľúčové úlohy pri raste, synaptickej plasticite a angiogenéze mozgu, by mohli významnou mierou podieľať na rozvoji depresie. Zároveň zmeny vo fyziologických koncentráciách vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora, monocytového chemotaktického proteínu-1 a epidermálneho rastového faktora by mohli participovať na adekvátnej či neadekvátnej reakcii pacienta na liečbu. Naša pilotná štúdia ukazuje, že u všetkých troch cytokínov dochádza u pacientov s depresiou k štatisticky významným zmenám koncentrácie v plazme. Rozšírenie súboru pacientov ako i ďalšie analýzy týchto cytokínov by mohli prispieť k ich využitiu ako potenciálnych biomarkerov.

POĎAKOVANIE

Táto publikácia vznikla vďaka podpore VEGA 1/0266/18.

REFERENCIE

<https://www.who.int/>

Fava M, Kendler KS. Major Depressive Disorder. *Neuron*. 2000; 28:335-341

Otte C, Gold SM, Penninx BW, Pariante CM, Etkin A, Fava M et al. Major depressive disorder. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016; 2(1)

Kronfol Z. *Cytokines and Mental Health*. Michigan: Springer, ©2003. ISBN 978-1-4613-5020-0

Ferrara N and Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2016; 15:385-403

Ferrara N, Gerber HP, Lecouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669-676

Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological response to hypoxia. *J Appl Physiol*. 2000; 88:1474-1480

Shim JW and Madsen JR. VEGF signaling in neurological disorders. *Int J Mol Sci*. 2018; 19:275

Koyanagi M, Egashira K, Kitamoto S, Ni W, Shimokawa H, Takeya M et al. Role of monocyte chemoattractant protein-1 in cardiovascular remodeling induced by chronic blockade of nitric oxide synthesis. *Circulation*. 2000; 102:2243-2248

Traynor TR, Herring AC, Dorf ME, Kuziel WA, Toews GB, Huffnagle GB. Differential roles of CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 in the development of T1 immunity. *J Immunol*. 2002; 168:4659- 4666

Schwarz MJ, Chiang S, Muller N, Ackenheil M. T-helper 1 and T-helper 2 responses in psychiatric disorders. *Brain Behav Immun*. 2001; 15:340-370

Iwakura Y, Zheng Y, Sibilio M, Abe Y, Piao YS, Yokomaku D et al. Qualitative and quantitative re-evaluation of epidermal growth factor-ErbB1 action on developing midbrain dopaminergic neurons in vivo and in vitro: target-derived neurotrophic signaling (Part 1). *J Neurochem*. 2011; 118:45-56

Eda T, Mizuno M, Araki K, Iwakura Y, Namba H, Somtoyama H et al. Neurobehavioral deficits of epidermal growth factor-overexpressing transgenic mice: impact on dopamine metabolism *Neurosci Lett*. 2013; 547:21-25

Carvalho AF, Kohler CA, McIntyre RS, Knochel C, Bruoni AR, Thase ME et al. Peripheral vascular endothelial growth factor as a novel depression biomarker: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2015; 62:18-26

Tseng P_T, Cheng Y_S, Xhen Y_W, Wu CH-K, Lin P-Y. Increased levels of vascular endothelial growth factor in patients with major depressive disorder. A meta-analysis. *Eur Neuropsychopharmacol* 2015; 25:1622-1630

Becerril-Villanueva E, Perez-Sanchez G, Alvarez-Herrera S, Giron-Perez MT, Arreola R, Cruz-Fuentes C et al. Alternations in the levels of growth factors in adolescents with major depressive disorder: a longitudinal study during treatment with fluoxetine. *Mediators Inflamm*. 2019; 9130868, doi: 10.1155/2019/9130868

Lee BH, Kim YK. Increased plasma VEGF levels in major depressive disorder or manic episodes in patients with mood disorders. *J Affect Disord*. 2012; 136:181-184

Kotan Z, Sarandol E, Kirhan E, Ozkaya G, Kirli S. Serum brain-derived neurotrophic factor, vascular endothelial growth factor and leptin in patients with a diagnosis of severe major depressive disorder with melancholic features. *Therap Advan Psychopharmacol*. 2012; 2:65-74

Ryan KM, McLoughlin DM. Vascular endothelial growth factor plasma levels in depression and following electroconvulsive therapy. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2018; 268:838-848

Pae C-U. The potential role of monocyte chemoattractant protein-1 for major depressive disorder. *Psychiatry Investig*. 2014; 11:217-222

Xiong GL, Prybol K, Boyle SH, Hall R, Streilein RD, Steffens DC et al. Inflammation markers and major depressive disorder in patients with chronic heart failure: results from the sertraline against depression and heart disease in chronic heart failure (SADHART-CHF) study. *Psychosom Med*. 2015; 77, 808-815

Eyre HA, Air T, Pradhan A, Johnston J, Lavretsky H, Stuart MJ, Baune BT. A meta-analysis of chemokines in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016; 68:1-8

Sutçigil L, Oktenli C, Musabak U, Bozkurt A, Canseyer A, Uzun O et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in major depression: effect of sertraline therapy. *Clin Dev Immunol*. 2007; doi: 10.1155/2007/76396